

KRIOPRESERVASI SPERMATOZOA EPIDIDIMIS DOMBA MENGUNAKAN PENGECER BERBASIS LESITIN

[*Cryopreservation of Ram Epididymal Spermatozoa Using Lecithin-Based Extender*]

M. Surachman, Herdis, M. A. Setiadi¹, dan M. Rizal²

Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Jakarta

¹Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

²Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Pattimura, Ambon

ABSTRAK

AndroMed merupakan pengencer semen komersial berisi bahan kimia yang komplis namun tidak mengandung kuning telur, sehingga diharapkan tidak ada kontaminasi mikroorganisme. Penelitian ini bertujuan menguji kualitas spermatozoa epididimis domba yang dibekukan dengan pengencer Tris dan AndroMed. Spermatozoa diencerkan dengan perlakuan pengencer sebagai berikut: pengencer Tris (Tris), 15% AndroMed + 85% akuabidestilata (AM15), 20% AndroMed + 80% akuabidestilata (AM20), dan 25% AndroMed + 75% akuabidestilata (AM25). Kualitas spermatozoa yang diamati terdiri atas: konsentrasi spermatozoa, persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, abnormalitas, butiran sitoplasma, dan membran plasma utuh (MPU). Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata konsentrasi spermatozoa, persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, abnormalitas, butiran sitoplasma, dan MPU spermatozoa segar adalah masing-masing: 11.660 juta/ml, 65%, 81%, 7,6%, 10,2%, dan 82,2%. Tidak terdapat perbedaan yang nyata antarperlakuan terhadap persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, dan MPU pada tahap setelah pengenceran dan ekuilibrasi. Pada tahap setelah thawing, rata-rata persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, dan MPU dari perlakuan AM20 dan Tris secara nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan AM15 dan AM25. Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa pengencer semen komersial AndroMed dan Tris memiliki kemampuan yang sama dalam melindungi spermatozoa domba pada proses pembekuan semen. Konsentrasi 20% AndroMed merupakan dosis optimum dalam proses pembekuan spermatozoa epididimis domba.

Kata kunci: spermatozoa epididimis domba, kriopreservasi, Tris, AndroMed

ABSTRACT

The AndroMed is a semen extender made from a completely mixed ingredients without egg yolk, therefore the AndroMed is microorganism-free extender. The purpose of this research was to examine the quality of frozen-thawed ram epididymal spermatozoa cryopreserving with Tris and AndroMed extenders. The spermatozoa was diluted with Tris extender (Tris), 15% AndroMed + 85% distilled water (AM15), 20% AndroMed + 80% distilled water (AM20), and 25% AndroMed + 75% distilled water (AM25), respectively. The quality of collected spermatozoa were concentration, percentages of motile, liveability, abnormality, cytoplasmic droplet, and intact plasma membrane (IPM) spermatozoa. The results showed that mean concentration, percentages of motile, liveability, abnormality, cytoplasmic droplet, and IPM of fresh spermatozoa were 11,660 million/ml, 65%, 81%, 7.6%, 10.2%, and 82.2%, respectively. There were no significant differences in percentages of motile, live, and IPM spermatozoa between treatments after dilution and equilibration stages. The mean percentages of post thawing motile, liveability, and IPM spermatozoa of AM20 and Tris were higher ($P < 0.05$) than AM15 and AM25. The AndroMed and Tris extenders had the same ability to protect spermatozoa in cryopreservation process. The concentration of 20% AndroMed was optimum dose in cryopreservation process of ram epididymal spermatozoa.

Keywords: ram epididymal spermatozoa, cryopreservation, Tris, AndroMed

PENDAHULUAN

Spermatozoa epididimis ternak atau hewan yang telah dipotong atau mati belum dimanfaatkan secara optimal sebagai salah satu alternatif sumber spermatozoa untuk memenuhi kebutuhan dalam penerapan berbagai teknologi reproduksi seperti inseminasi buatan (IB) dan produksi embrio secara *in vitro*. Menurut Axner *et al.* (1999) serta Hafez dan Hafez (2000), spermatozoa yang berasal dari bagian *cauda* epididimis telah bergerak (motil) dan mampu membuahi oosit yang sama baiknya dengan spermatozoa hasil ejakulasi. Hal ini karena spermatozoa yang ada di bagian *cauda* epididimis telah melewati proses pematangan di bagian *caput* dan *corpus* (Axner *et al.*, 1999). Proses pematangan ditandai oleh berpindahnya posisi butiran sitoplasma (*cytoplasmic droplet*) dari bagian proksimal ke arah distal ekor atau hilang sama sekali dari ekor spermatozoa (Toelihere, 1993).

Upaya pengolahan spermatozoa yang dikoleksi dari *cauda* epididimis dalam bentuk semen cair atau beku untuk keperluan aplikasi berbagai teknologi reproduksi menjadi metode alternatif yang dapat diterapkan pada ternak yang memiliki kualitas genetik unggul, tapi tidak dapat melakukan aktivitas kawin secara alamiah serta tidak respons terhadap upaya menampung semen menggunakan alat bantu. Metode ini juga dapat diterapkan pada ternak atau hewan yang mati secara mendadak. Dengan demikian, metode ini dapat menjadi salah satu pilihan dalam upaya konservasi dan penyelamatan plasma nutfah hewan langka atau hewan buas dan liar.

Dalam proses pembekuan (kriopreservasi) semen, akibat perlakuan suhu yang sangat rendah (-196 °C) akan terbentuk kristal-kristal es dan perubahan konsentrasi elektrolit intraseluler yang menyebabkan terjadinya kerusakan pada sel spermatozoa. Pemilihan jenis pengencer yang tepat merupakan salah satu cara mengurangi kerusakan akibat proses pembekuan. Pengencer yang telah umum digunakan dalam proses kriopreservasi semen dan telah dikenal luas adalah pengencer susu skim, susu segar, Tris, sitrat, laktosa, dan lain-lain. Dewasa ini, beberapa perusahaan telah memproduksi pengencer semen komersial siap pakai seperti Laiciphos, Biociphos plus, Biladyl, Triladyl, dan lain-lain. Pengencer-pengencer semen komersial tersebut memudahkan dalam penggunaannya karena telah tersedia dalam paket

siap pakai dan mengandung seluruh bahan-bahan yang diperlukan untuk kriopreservasi semen. Namun demikian, beberapa pengencer semen komersial tersebut seperti Laiciphos, Biladyl, dan Triladyl tetap menggunakan kuning telur sebagai salah satu komponen penyusun, yang diketahui mengandung berbagai jenis mikroorganisme dan mungkin menjadi media penyebar beberapa penyakit menular. Menurut Bousseau *et al.* (1998), pengencer semen komersial yang mengandung kuning telur seperti Triladyl dan Laiciphos terkontaminasi oleh bakteri atau mycoplasma sebanyak 10–60 CFU/ml. Selanjutnya dinyatakan bahwa pengencer semen komersial yang tidak mengandung kuning telur seperti Biociphos plus tidak terkontaminasi bakteri. Froning (1998) melaporkan bahwa telur ayam ras mengandung *Salmonella typhimurium* sebanyak rata-rata 67,09 CFU/ml.

Salah satu pengencer semen komersial yang tidak mengandung kuning telur adalah AndroMed produksi Minitübe Jerman. Pengencer semen komersial ini selain tidak terkontaminasi mikroorganisme yang berasal dari kuning telur juga mudah digunakan karena telah tersedia dalam paket siap pakai. Dengan demikian, diharapkan bahwa penggunaan pengencer semen komersial seperti AndroMed dalam proses kriopreservasi semen selain dapat meningkatkan kualitas semen beku, juga dapat mencegah terjadinya penularan bibit penyakit yang mungkin terdapat di dalam kuning telur. Penelitian ini bertujuan menguji kualitas spermatozoa epididimis domba yang dibekukan dengan pengencer Tris dan AndroMed.

MATERI DAN METODE

Testis beserta epididimis domba sebanyak lima buah diperoleh dari rumah pemotongan hewan (RPH) di Bogor. Epididimis dipisahkan dari testis kemudian dibersihkan dan dimasukkan ke dalam tabung gelas yang telah diisi dengan larutan NaCl fisiologis dan dibawa ke laboratorium pada kondisi suhu lingkungan. Setelah tiba di laboratorium, spermatozoa dikoleksi dari bagian *cauda* epididimis dengan cara membuat sayatan-sayatan menggunakan gunting steril kemudian dibilas-tekan dengan larutan NaCl fisiologis sebanyak 4 ml (Rizal, 2004).

Spermatozoa hasil koleksi dibagi ke dalam empat buah tabung reaksi dengan volume yang

sama, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Supernatan dibuang dan sedimen (spermatozoa) diencerkan kembali dengan pengencer sesuai perlakuan pada konsentrasi 100 juta spermatozoa motil per 0,25 ml. Perlakuan pengencer yang diuji adalah: pengencer Tris yang mengandung 20% kuning telur dan 5% gliserol (Tris), pengencer komersial 15% AndroMed + 85% akuabidestilata (AM15), pengencer komersial 20% AndroMed + 80% akuabidestilata (AM20), dan pengencer komersial 25% AndroMed + 75% akuabidestilata (AM25).

Spermatozoa yang telah diencerkan dikemas di dalam *straw* mini (0,25 ml) kemudian diekuilibrasikan di dalam lemari es pada suhu 3 – 5 °C selama tiga jam. Setelah ekuilibrasikan, spermatozoa dibekukan dengan cara meletakkan *straw-straw* 10 cm di atas permukaan nitrogen cair (suhu sekitar –130 °C) selama 15 menit. Selanjutnya *straw* dimasukkan ke dalam kontainer nitrogen cair (suhu sekitar –196 °C). Setelah disimpan selama tujuh hari, *straw* masing-masing perlakuan *dithawing* dengan cara memasukkan ke dalam air bersuhu 37 °C di dalam penangas air selama 30 detik untuk dievaluasi kualitas spermatozoanya.

Evaluasi Kualitas Spermatozoa

Kualitas spermatozoa dievaluasi segera setelah dikoleksi dan setelah perlakuan. Kualitas spermatozoa yang dievaluasi segera setelah dikoleksi (karakteristik spermatozoa segar) adalah: konsentrasi, persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, spermatozoa abnormal, spermatozoa yang memiliki butiran sitoplasma, dan spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh (MPU). Perubahan kualitas spermatozoa yang dievaluasi setelah perlakuan adalah: persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, dan membran plasma utuh (MPU) masing-masing setelah tahap pengenceran, ekuilibrasikan, dan *thawing*.

Konsentrasi spermatozoa: konsentrasi spermatozoa hasil koleksi sebelum diencerkan. Dihitung menggunakan kamar hitung Neubauer. *Persentase spermatozoa motil*: persentase spermatozoa yang bergerak progresif. Ditentukan secara subjektif pada delapan lapang pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Angka yang diberikan berkisar antara 0% dan 100% dengan skala 5%. *Persentase spermatozoa hidup*: persentase spermatozoa yang hidup. Ditentukan dengan menggunakan pewarnaan 2% eosin B (Toelihere, 1993). Sperma-

tozoa yang hidup ditandai oleh kepala berwarna putih, sedangkan yang mati ditandai oleh kepala berwarna merah. Sebanyak minimum 200 spermatozoa dievaluasi dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. *Persentase spermatozoa abnormal* dan butiran sitoplasma dievaluasi menggunakan preparat yang digunakan untuk mengevaluasi persentase spermatozoa hidup. *Persentase MPU*: persentase spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh. Ditentukan dengan metode *osmotic resistance test* (ORT) atau *hypoosmotic swelling* (HOS) *test* (Revell dan Mrode, 1994). Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor yang melingkar atau menggelembung, sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor yang lurus apabila semen dipaparkan di dalam larutan hipoosmotik dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit. Sebanyak minimum 200 spermatozoa dievaluasi dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x.

Analisis Data

Data dianalisis dengan analisis ragam dalam bentuk rancangan acak lengkap dengan empat perlakuan dan lima kali ulangan. Perbedaan antarperlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil (Steel dan Torrie, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Spermatozoa Segar

Hasil penelitian diperoleh konsentrasi spermatozoa rata-rata 11.660 juta sel/ml (berkisar antara 10.390 dan 12.420 juta sel/ml) (Tabel 1). Hasil yang diperoleh masih dalam kisaran jumlah seperti yang dilaporkan Senger (1999) bahwa konsentrasi spermatozoa di bagian *cauda* epididimis hewan mamalia sebanyak 10.000 – 50.000 juta sel/ml. Akan tetapi, hasil yang diperoleh ini lebih rendah dibandingkan dengan yang dilaporkan beberapa peneliti sebelumnya. Konsentrasi spermatozoa di bagian *cauda* epididimis domba sebesar 37.000 – 63.000 juta sel/ml (Tomes *et al.*, 1979) dan sebanyak rata-rata 13.993,33 juta sel/ml (berkisar antara 13.530 dan 14.520 juta sel/ml) pada domba Garut (Rizal *et al.*, 2004).

Persentase spermatozoa motil dan spermatozoa hidup yang diperoleh masing-masing rata-rata 65% dan 81% (kisaran 79 – 83%) (Tabel 1). Rizal *et al.* (2004) melaporkan persentase spermatozoa motil dan spermatozoa hidup *cauda* epididimis domba Garut masing-masing rata-rata

70,83% dan 82,83%. Hasil beberapa penelitian juga dilaporkan bahwa persentase spermatozoa motil *cauda* epididimis setelah diencerkan sebesar 77 – 81% pada domba Suffolk dan Dorset (Graham, 1994), 50 – 80% pada domba (Senger, 1999), 70 – 75% pada badak (Lubbe *et al.*, 1999), 38 – 77% pada kuda (Squires *et al.*, 2000), rata-rata 64% pada

kualitas spermatozoa epididimis domba selama proses kriopreservasi.

Di dalam pengencer Tris yang mengandung kuning telur terdapat lipoprotein berupa fosfatidil kolin (lesitin), yang menjadi target utama penggunaan kuning telur sebagai salah satu bahan penyusun pengencer semen dalam proses

Tabel 1. Karakteristik Spermatozoa *Cauda* Epididimis Domba

Peubah kualitas spermatozoa	Rata-rata
Konsentrasi spermatozoa (juta sel/ml)	11.660 ± 90,38
Spermatozoa motil (%)	65,00 ± 0,00
Spermatozoa hidup (%)	81,00 ± 1,26
Spermatozoa abnormal (%)	7,60 ± 1,02
Butiran sitoplasma (%)	10,20 ± 1,17
Membran plasma utuh (%)	82,20 ± 1,60

monyet ekor panjang (Feradis *et al.*, 2001), dan rata-rata 57,6% pada rusa merah (Soler *et al.*, 2003).

Persentase spermatozoa abnormal, butiran sitoplasma, dan MPU yang diperoleh masing-masing rata-rata 7,6% (kisaran 6 – 9%), 10,2% (kisaran 8 – 11%), dan 82,2% (kisaran 80 – 84%) (Tabel 1). Hasil yang diperoleh kurang lebih sama dengan yang dilaporkan Rizal *et al.* (2004) bahwa persentase spermatozoa abnormal, butiran sitoplasma, dan MPU spermatozoa *cauda* epididimis domba Garut masing-masing rata-rata 10,83%, 8,5%, dan 81,33%. Persentase MPU yang diperoleh lebih rendah dibandingkan dengan pada spermatozoa rusa merah, yakni lebih dari 90% (Soler *et al.*, 2003), tetapi lebih tinggi dibandingkan dengan pada spermatozoa monyet ekor panjang yang hanya rata-rata 63,5% (Feradis *et al.*, 2001).

Kualitas Spermatozoa Setelah Perlakuan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kualitas spermatozoa yang telah dibekukan pada perlakuan Tris dan AM20 lebih baik dibandingkan dengan perlakuan AM15 dan AM25. Pada tahap setelah *thawing*, persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, dan MPU perlakuan Tris (38%, 47,8%, dan 41,2%) dan AM20 (39%, 50,6%, dan 42,6%) nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan AM15 (32%, 39,2%, dan 34,6%) dan AM25 (28%, 37,2%, dan 32,4%) (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa pengencer Tris dan AndroMed dalam dosis yang tepat memiliki kemampuan yang sama dalam mempertahankan

kriopreservasi semen. Lesitin dari kuning telur ini berfungsi melindungi membran plasma sel spermatozoa dari pengaruh kejutan dingin (*cold shock*) selama proses kriopreservasi semen berlangsung. Sumber lesitin di dalam pengencer semen komersial AndroMed berasal dari ekstrak kacang kedelai, yang juga dapat menjalankan fungsi seperti pada lesitin kuning telur. Hasil penelitian Aku (2005) didapatkan bahwa di samping lesitin, AndroMed juga mengandung protein, karbohidrat (fruktosa, glukosa, manosa, dan maltotriosa), mineral (natrium, kalsium, kalium, magnesium, klorida, fosfor, dan mangan), asam sitrat, gliserol, lemak, lesitin, dan gliserilfosforil kolin (GPC). Selanjutnya dilaporkan bahwa AndroMed mengandung lesitin yang cukup tinggi, yakni sebanyak 6.76 g/100 ml. Seluruh bahan-bahan yang terkandung di dalam pengencer semen komersial AndroMed tersebut merupakan bahan-bahan yang telah umum digunakan dalam menyusun pengencer semen selama ini. Menurut Toelihere (1993) dalam proses kriopreservasi semen, pengencer semen harus mengandung sumber energi (karbohidrat, terutama monosakarida), mineral, protein, zat penyangga (*buffer*), zat pencegah kejutan dingin (lipoprotein khususnya lesitin), krioprotektan (gliserol dan juga berbagai jenis gula), dan antibiotik, serta tidak toksik terhadap spermatozoa.

Pada perlakuan AM15 dan AM25 dihasilkan kualitas spermatozoa yang lebih rendah setelah *thawing* diduga karena ketidaksesuaian konsentrasi komponen dan tekanan osmotik

larutan pengencer tersebut. Pada perlakuan AM15 diduga kandungan gliserol pengencer rendah, sehingga kemampuan untuk melindungi spermatozoa selama proses kriopreservasi kurang memadai. Demikian pula halnya dengan komponen lain seperti lesitin, yang berfungsi melindungi membran plasma sel spermatozoa dari pengaruh kejutan dingin selama proses pengolahan berlangsung. Sedangkan pada perlakuan AM25 diduga mengandung gliserol dan tekanan osmotik larutan yang tinggi, sehingga menyebabkan spermatozoa tidak mampu mengadaptasinya dengan baik. Menurut Fahy (1986), konsentrasi gliserol yang dimasukkan di dalam pengencer untuk pembekuan semen domba dibatasi oleh sifat toksiknya yang bergantung pada tingkat pendinginan dan pembekuan, komposisi pengencer, metode penambahan, dan jenis spermatozoa.

Hasil penelitian ini diperoleh bahwa kualitas spermatozoa *cauda* epididimis yang telah dibekukan lebih rendah dibandingkan dengan spermatozoa hasil ejakulasi. Sebagai perbandingan, persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, dan MPU semen beku domba Garut (hasil ejakulasi) adalah masing-masing sebesar 46,67%, 52,33%, dan 48,44% (Rizal, 2005). Fenomena rendahnya kualitas spermatozoa yang dikoleksi dari bagian *cauda* epididimis dan telah dibekukan dibandingkan dengan spermatozoa hasil ejakulasi juga dilaporkan oleh peneliti sebelumnya. Garde *et al.* (2000) melaporkan persentase spermatozoa motil semen hasil ejakulasi

rusa merah Iberian rata-rata 51,7%, lebih tinggi dibandingkan dengan spermatozoa epididimis yang hanya rata-rata 45%. Hasil serupa juga dilaporkan Squires *et al.* (2000) bahwa persentase spermatozoa motil kuda setelah *thawing* rata-rata 5% dan 23% masing-masing untuk spermatozoa *cauda* epididimis dan hasil ejakulasi. Hal ini diduga karena tidak seperti pada spermatozoa hasil ejakulasi, spermatozoa *cauda* epididimis tidak disertai plasma semen yang disintesis oleh kelenjar asesoris hewan jantan. Plasma semen mengandung berbagai jenis makromolekul dan zat-zat nutrien lainnya seperti glikoprotein yang disintesis oleh kelenjar vesikularis dan berfungsi melindungi membran plasma sel spermatozoa dari kerusakan akibat pengaruh kejutan dingin saat spermatozoa dikoleksi. Menurut Situmorang *et al.* (1995) glikoprotein yang disintesis oleh kelenjar vesikularis tersebut bersifat khas, dan peranannya dalam melindungi membran plasma sel spermatozoa tidak dapat sepenuhnya digantikan oleh glikoprotein eksogen yang ditambahkan di dalam pengencer semen. Kualitas spermatozoa *cauda* epididimis domba Suffolk dan Dorset (Graham, 1994) dan spermatozoa *cauda* epididimis kuda (Squires *et al.*, 2000) dapat ditingkatkan dengan cara menambahkan plasma semen sebelum spermatozoa diencerkan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pengencer semen komersial

Tabel 2. Rata-rata Persentase Spermatozoa Motil, Spermatozoa Hidup, dan MPU Spermatozoa *cauda* Epididimis Domba

Peubah kualitas	Tahap pengolahan	Perlakuan			
		Tris	AM15	AM20	AM25
Spermatozoa motil (%)	Pengenceran	65,00 ± 0,00 ^a	65,00 ± 0,00 ^a	65,00 ± 0,00 ^a	65,00 ± 0,00 ^a
	Ekuilibrasi	58,00 ± 2,45 ^a	56,00 ± 2,00 ^a	59,00 ± 2,00 ^a	57,00 ± 2,45 ^a
	<i>Thawing</i>	38,00 ± 2,45 ^b	32,00 ± 2,45 ^a	39,00 ± 2,00 ^b	28,00 ± 4,00 ^a
Spermatozoa hidup (%)	Pengenceran	76,20 ± 1,17 ^a	76,80 ± 1,94 ^a	76,00 ± 0,89 ^a	76,60 ± 2,00 ^a
	Ekuilibrasi	68,00 ± 0,63 ^a	67,40 ± 1,74 ^a	68,20 ± 0,75 ^a	67,40 ± 0,80 ^a
	<i>Thawing</i>	47,80 ± 3,43 ^b	39,20 ± 1,17 ^a	50,60 ± 1,36 ^b	37,20 ± 1,60 ^a
MPU (%)	Pengenceran	77,00 ± 1,79 ^a	77,60 ± 0,80 ^a	77,80 ± 0,40 ^a	76,60 ± 1,96 ^a
	Ekuilibrasi	68,20 ± 0,75 ^a	68,20 ± 0,40 ^a	68,80 ± 0,75 ^a	67,40 ± 0,80 ^a
	<i>Thawing</i>	41,20 ± 1,33 ^b	34,60 ± 2,73 ^a	42,60 ± 1,50 ^b	32,40 ± 2,15 ^a

^{a,b} Superskrip dalam baris yang sama, menunjukkan berbeda nyata (P<0,05)

Tris: perlakuan pengencer Tris,

AM15: perlakuan pengencer 15% AndroMed + 85% akuabidestilata,

AM20: perlakuan pengencer 20% AndroMed + 80% akuabidestilata, dan

AM25: perlakuan pengencer 25% AndroMed + 75% akuabidestilata.

AndroMed dalam dosis tepat memiliki kemampuan yang sama dengan pengencer Tris dalam mempertahankan kualitas spermatozoa epididimis domba selama proses kriopreservasi. Konsentrasi 20% AndroMed merupakan dosis optimum dalam proses kriopreservasi spermatozoa epididimis domba.

DAFTAR PUSTAKA

- Aku, A.S. 2005. Preservasi dan Kriopreservasi Semen Domba Garut (*Ovis aries*) dalam Berbagai Jenis Pengencer Berbasis Lesitin. Tesis. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Axner, E., C.L. Forsberg, and S. Einarsson. 1999. Morphology and motility of spermatozoa from different region of the epididymal duct in the domestic cat. *Theriogenology* 45:767-777.
- Bousseau, S., J.P. Brillard, B. Marguant-Le Guienne, B. Guerin, A. Camus, and M. Lechat. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology* 50:699-706.
- Fahy, G.M. 1986. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology* 23:1-13
- Feradis, D. Pawitri, I.K. Suatha, M. Rizal Amin, T.L. Yusuf, D. Sajuthi, I.N. Budiarsa, and E.S. Hayes. 2001. Cryopreservation of epididymal spermatozoa collected by needle biopsy from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Med. Primatol.* 30:100-106.
- Froning, G.W. 1998. Recent advances in egg products research and development. Presented at the University of California Egg Processing Workshop. Riverside and Modesto, June 2-3, 1998.
- Garde, J., E. Anel, A. Garcia-Diaz, J.C. Boixo, A. Soler, P. de Paz, A. Lopez-Saez, C. Guerra, and L. Anel. 2000. Evaluation of two glycerol concentrations in freezing of electroejaculated and epididymal spermatozoa from iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Proceedings 14th International Congress on Animal Reproduction*. Stockholm, 2-6 July 2000. Abstract Vol. 2, 17:14.
- Graham, J.K. 1994. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology* 41:1151-1162.
- Hafez, E.S.E. and B. Hafez. 2000. *Reproduction in Farm Animals 7th Edition*. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
- Lubbe, K., R.L. Smith, P. Bartels, and R.A. Godke. 1999. Freezing epididymal sperm from white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) treated with different cryodiluents. *Theriogenology* 51:288. Abstract.
- Revell, S.G. and R.A. Mrode. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36:77-86.
- Rizal, M. 2004. Penyimpanan epididimis domba pada suhu 5 °C selama tiga hari: pengaruhnya terhadap kualitas spermatozoa yang telah dibekukan. *Media Kedokteran Hewan* 20:57-61.
- Rizal, M. 2005. Efektivitas berbagai konsentrasi β -karoten terhadap kualitas semen beku domba garut. *Animal Production* 7:6-13.
- Rizal, M., M.R. Toelihere, T.L. Yusuf, B. Purwantara, dan P. Situmorang. 2004. Pengaruh waktu penyimpanan epididimis pada suhu 5 °C terhadap kualitas spermatozoa epididimis domba garut. *J. Veteriner* 5:95-103.
- Senger, P.L. 1999. The organization and function of the male reproductive system. *In: Pathways to Pregnancy and Parturition*. Current Conceptions, Inc., Pullman. P. 51.

- Situmorang, P., E. Triwulanningsih, K. Diwyanto, I.G. Putu, dan A.R. Siregar. 1995. Pengaruh seminal plasma sapi terhadap daya hidup sperma kerbau. Ilmu dan Peternakan, Edisi Khusus. Hlm. 100-108.
- Soler, A.J., M.D. Perez-Guzman, and J.J. Garde. 2003. Storage of red deer epididymides for four days at 5 °C: effects on sperm motility, viability, and morphology integrity. J. Exp. Zool. 295A:188-199.
- Squires, E.L., C. Gomez-Cuetara, and J.K. Graham. 2000. Effect of seminal plasma on cryopreserving epididymal and ejaculated stallion spermatozoa. Proceedings 14th International Congress on Animal Reproduction. Stockholm, 2-6 July 2000. Abstract Vol. 2, 17:38.
- Steel, R.G.D. dan J.H. Torrie. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Toelihere, M.R. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa, Bandung.
- Tomes, G.L., D.E. Robertson, and Lightfoot. 1979. Sheep Breeding 2nd Edition. Butterworths, London.